

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 64-043192

(43)Date of publication of application : 15.02.1989

(51)Int.Cl.

C12N 15/00
C12N 1/20
C12N 9/06
// (C12N 9/06
C12R 1:19)

(21)Application number : 62-199460

(71)Applicant : TOYO JOZO CO LTD

(22)Date of filing : 10.08.1987

(72)Inventor : SAGAI HITOSHI
MASUJIMA HARUMI
SUZUKI YASUSHI
IKUTA SHIGERU

(54) DNA HAVING GENETIC INFORMATION ON SARCOSINE OXIDASE AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain sarcosine oxidase useful in the field of clinical diagnosis and research with high productivity using a low contaminating enzyme content without requiring an inducer in a culture medium in production, by applying a genetic engineering technique.

CONSTITUTION: A polydeoxyribonucleic acid, containing a base sequence capable of coding an amino acid sequence of a polypeptide which is a constituent component of sarcosine oxidase, capable of catalyzing enzymic reaction for producing on molecule each of glycine, formaldehyde and hydrogen peroxide from one molecule each of sarcosine, oxygen and hydrogen, having specificity for sarcosine, 8.0W9.5 optimum pH, 4.7 ± 0.1 isoelectric point and $40,000 \pm 4,000$ mol.wt. measured by a gel filtration method and stable by treatment at 40° C for 10min. A transformant holding the above-mentioned polydeoxyribonucleic acid is cultivated to afford the aimed sarcosine oxidase having ≤ 0.05 unit catalase activity, ≤ 0.0004 unit creatinase and ≤ 0.03 unit N-ethyl-glycine oxidase activity based on 1 unit sarcosine oxidase activity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①⑫ **Offenlegungsschrift**
①⑪ **DE 3827 168 A1**

②① Aktenzeichen: P 38 27 168.0
②② Anmeldetag: 10. 8. 88
②③ Offenlegungstag: 23. 2. 89

⑤① Int. Cl. 4:
C12N 9/02
C 12 P 19/34
C 07 K 13/00
C 12 P 21/00
C 12 N 15/00
G 01 N 33/50
// (C12N 9/02,
C12R 1:19)C12Q 1/26

Behördenabteilung

DE 3827 168 A1

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①
10.08.87 JP P 199460/87

⑦① Anmelder:
Toyo Jozo Co., Ltd., Shizuoka, JP

⑦④ Vertreter:
Wächtershäuser, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anw., 8000 München

⑦② Erfinder:
Sagai, Hitoshi; Masujima, Harumi, Mishima,
Shizuoka, JP; Ikuta, Shigeru; Suzuki, Koji, Shizuoka,
JP

⑤④ DNA mit genetischer Information von Sarcosinoxidase

Es wird eine neue Polydesoxyribonucleinsäure beschrieben. Die Polydesoxyribonucleinsäure hat eine Basensequenz, welche für eine Aminosäuresequenz eines Polypeptids codiert, welches einen Bestandteil einer Sarcosinoxidase darstellt. Diese Sarcosinoxidase ist ein Enzym mit den folgenden physikochemischen Eigenschaften:

(a) Wirkung: katalysiert eine enzymatische Reaktion, bei der jeweils 1 Mol Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid aus jeweils 1 Mol Sarcosin, Sauerstoff und Wasser gemäß dem folgenden Reaktionsschema gebildet wird:



(b) Substratspezifität: zeigt eine Substratspezifität gegenüber Sarcosin;

(c) optimaler pH: 8,0 bis 9,5;

(d) isoelektrischer Punkt: $4,7 \pm 0,1$;

(e) Molekulargewicht (bestimmt nach der Gelfiltrations-Methode): 40000 ± 4000 ;

(f) thermische Stabilität: stabil nach Behandlung bei 40°C während 10 Minuten.

Sarcosinoxidase ermöglicht ein biologisches Verfahren für die quantitative Analyse eines Creatinins und/oder Creatins und ist von Bedeutung sowohl bei Laborexperimenten als auch bei klinischen Diagnoseverfahren.

DE 3827 168 A1

Patentansprüche

1. Eine Polydesoxyribonucleinsäure mit einer Basensequenz, welche eine Aminosäuresequenz eines Polypeptids codiert, welches eine Sarcosinoxidase darstellt, dadurch gekennzeichnet, daß die Sarcosinoxidase die folgenden physikochemischen Eigenschaften aufweist:

(a) Wirkung: katalysiert eine enzymatische Reaktion, bei der jeweils 1 Mol Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid aus jeweils 1 Mol Sarcosin, Sauerstoff und Wasser gemäß dem folgenden Reaktionsschema gebildet wird:



(b) Substratspezifität: zeigt eine Substratspezifität gegenüber Sarcosin;

(c) optimaler pH: 8,0 bis 9,5;

(d) isoelektrischer Punkt: $4,7 \pm 0,1$;

(e) Molekulargewicht (bestimmt nach der Gelfiltrations-Methode): $40\,000 \pm 4000$;

(f) thermische Stabilität: stabil nach Behandlung bei 40°C während 10 Minuten.

2. Polydesoxyribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polydesoxyribonucleinsäure eine Basensequenz umfaßt, welche für eine Polypeptid-Aminosäuresequenz der folgenden Formel, beginnend vom N-Ende, codiert:

A - Ser Thr His Phe Asp Val Ile Val Val
Gly Ala Gly Ser Met Gly Met Ala Ala Gly
Tyr Gln Leu Ala Lys Gln Gly Val Lys Thr
Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Pro Pro His
Thr Asn Gly Ser His His Gly Asp Thr Arg
Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg
Glu Tyr Val Pro Leu Ala Leu Arg Ser Gln
Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Thr
His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val
Leu Val Phe Gly Pro Lys Gly Glu Ser Ala
Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
Glu His Ser Leu Thr Val Asp Leu Leu Glu
Gly Asp Glu Ile Asn Lys Arg Trp Pro Gly
Ile Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile
Phe Glu Pro Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser
Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg Glu Leu
Ala Glu Ala Arg Gly Ala Lys Val Leu Thr
His Thr Arg Val Glu Asp Phe Asp Ile Ser
Pro Asp Ser Val Lys Ile Glu Thr Ala Asn

Gly Ser Tyr Thr Ala Asp Lys Leu Ile Val
Ser Met Gly Ala Trp Asn Ser Lys Leu Leu
Ser Lys Leu Asn-Leu Asp Ile Pro Leu Gln
Pro Tyr Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu
Ser Asp Glu Ser Lys Tyr Ser Asn Asp Ile
Asp Phe Pro Gly Phe Met Val Glu Val Pro
Asn Gly Ile Tyr Tyr Gly Phe Pro Ser Phe
Gly Gly Cys Gly Leu Lys Leu Gly Tyr His
Thr Phe Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr
Ile Asn Arg Glu Phe Gly Val Tyr Pro Glu
Asp Glu Ser Asn Leu Arg Ala Phe Leu Glu
Glu Tyr Met Pro Gly Ala Asn Gly Glu Leu
Lys Arg Gly Ala Val Cys Met Tyr Thr Lys
Thr Leu Asp Glu His Phe Ile Ile Asp Leu
His Pro Glu His Ser Asn Val Val Ile Ala
Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
Ser Ser Gly Val Gly Glu Val Leu Ser Gln
Leu Ala Leu Thr Gly Lys Thr Glu His Asp
Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala
Leu Lys Glu Ser Leu Gln Lys Thr Thr Ile

- B

wobei A für einen Aminosäurerest oder ein Wasserstoffatom steht und B einen Aminosäurerest oder —OH bedeutet.

3. Polydesoxyribonucleinsäure gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polydesoxyribonucleinsäure eine Basensequenz der folgenden Formel, beginnend vom 5'-Ende, aufweist:

X — AGC ACA CAT TTT GAT GTC ATC GTT GTT	5
GGA GCT GGA TCA ATG GGA ATG GCG GCA GGT	
TAT CAA TTA GCA AAG CAA GGA GTC AAA ACA	10
TTA TTA GTG GAT GCA TTT GAT CCG CCG CAT	
ACA AAC GGA AGC CAT CAC GGT GAT ACT CGT	15
ATC ATC CGC CAT GCT TAC GGT GAG GGA AGA	
GAA TAT GTT CCT CTT GCA TTA AGA TCA CAA	20
GAG TTA TGG TAT GAA CTA GAA AAA GAA ACA	
CAC CAT AAA ATA TTC ACG AAA ACG GGC GTA	25
CTC GTA TTT GGT CCT AAA GGT GAA TCG GCT	
TTC GTT GCA GAA ACG ATG GAA GCG GCA AAG	30
GAA CAT TCA TTG ACT GTT GAT TTA CTG GAA	
GGT GAT GAA ATA AAT AAG CGT TGG CCG GGT	35
ATA ACG GTT CCG GAA AAC TAC AAT GCT ATT	
TTC GAA CCG AAC TCA GGT GTA TTA TTC AGT	40
GAA AAT TGT ATT CGT GCC TAC CGC GAG TTA	
GCT GAA GCG CGA GGT GCT AAA GTT CTA ACA	45
	50
	55
	60
	65

OS 38 27 168

CAT ACA CGC GTT GAG GAC TTT GAC ATT TCA
CCG GAC TCA GTC AAA ATC GAA ACA GCA AAT
GGA TCA TAC ACA GCT GAT AAA TTA ATT GTT
AGC ATG GGA GCT TGG AAT AGC AAA CTA CTT
TCA AAA CTA AAT CTT GAC ATC CCA TTA CAG
CCA TAT CGT CAA GTG GTA GGT TTC TTT GAA
TCC GAT GAA TCA AAG TAT AGC AAT GAT ATT
GAT TTC CCA GGA TTC ATG GTT GAA GTG CCA
AAT GGT ATT TAT TAC GGA TTC CCA AGC TTC
GGC GGC TGT GGA TTG AAA CTA GGA TAT CAT
ACG TTC GGG CAG AAA ATT GAC CCT GAT ACA
ATT AAT CGC GAA TTT GGC GTT TAT CCA GAA
GAT GAA AGT AAT CTT CGC GCT TTC TTG GAA
GAA TAT ATG CCA GGA GCA AAT GGA GAG TTA
AAA AGA GGG GCA GTC TGC ATG TAC ACG AAA
ACA TTA GAT GAA CAT TTC ATT ATA GAC TTA
CAT CCT GAA CAT TCC AAC GTA GTC ATC GCT
GCC GGC TTC TCT GGC CAT GGA TTT AAG TTT
TCC AGT GGA GTT GGT GAA GTG CTA AGT CAA
TTA GCT TTA ACT GGT AAA ACA GAG CAC GAT
ATT TCA ATC TTC TCC ATT AAC CGT CCT GCT
TTG AAA GAA TCG TTA CAA AAA ACA ACT ATC

- Y

wobei X für ein Codon mit Ausnahme von TAA, TAG oder TGA oder für ein Wasserstoffatom steht und Y ein Codon oder ein Wasserstoffatom bedeutet.

4. Ein Transformant, umfassend eine Polydesoxyribonucleinsäure, die bezüglich des Wirts-Mikroorganismus fremd ist und die in Anspruch 1 angegebene Definition hat.

5. Transformant gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polydesoxyribonucleinsäure die in Anspruch 2 definierte Polydesoxyribonucleinsäure ist. 5

6. Transformant gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Polydesoxyribonucleinsäure die in Anspruch 3 definierte Polydesoxyribonucleinsäure ist.

7. Transformant gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirts-Mikroorganismus ein Mikroorganismus ist, der zu *Escherichia coli* gehört. 10

8. Transformant gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Transformant *Escherichia coli* DHI pOXI103 ist (hinterlegt bei Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology; Hinterlegungsnr. 1828, FERM BP-1828).

9. Eine Sarcosinoxidase, die eine Catalase-Aktivität von unter 0,05 Einheiten, eine Creatinase-Aktivität von unter 0,0004 Einheiten und eine N-Ethylglycinoxidase-Aktivität von unter 0,03 Einheiten pro Einheit Aktivität der Sarcosinoxidase aufweist. 15

10. Polypeptid mit einer Basensequenz, welche für eine Aminosäuresequenz der folgenden Formel, beginnend vom N-Ende, codiert:

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

OS 38 27 168

A - Ser Thr His Phe Asp Val Ile Val Val
 Gly Ala Gly Ser Met Gly Met Ala Ala Gly
 Tyr Gln Leu Ala Lys Gln Gly Val Lys Thr
 Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Pro Pro His
 Thr Asn Gly Ser His His Gly Asp Thr Arg
 Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg
 Glu Tyr Val Pro Leu Ala Leu Arg Ser Gln
 Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Thr
 His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val
 Leu Val Phe Gly Pro Lys Gly Glu Ser Ala
 Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
 Glu His Ser Leu Thr Val Asp Leu Leu Glu
 Gly Asp Glu Ile Asn Lys Arg Trp Pro Gly
 Ile Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile
 Phe Glu Pro Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser
 Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg Glu Leu
 Ala Glu Ala Arg Gly Ala Lys Val Leu Thr
 His Thr Arg Val Glu Asp Phe Asp Ile Ser
 Pro Asp Ser Val Lys Ile Glu Thr Ala Asn
 Gly Ser Tyr Thr Ala Asp Lys Leu Ile Val
 Ser Met Gly Ala Trp Asn Ser Lys Leu Leu
 Ser Lys Leu Asn Leu Asp Ile Pro Leu Gln
 Pro Tyr Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu

Ser Asp Glu Ser Lys Tyr Ser Asn Asp Ile
 Asp Phe Pro Gly Phe Met Val Glu Val Pro
 Asn Gly Ile Tyr Tyr Gly Phe Pro Ser Phe
 Gly Gly Cys Gly Leu Lys Leu Gly Tyr His
 Thr Phe Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr
 Ile Asn Arg Glu Phe Gly Val Tyr Pro Glu
 Asp Glu Ser Asn Leu Arg Ala Phe Leu Glu
 Glu Tyr Met Pro Gly Ala Asn Gly Glu Leu
 Lys Arg Gly Ala Val Cys Met Tyr Thr Lys
 Thr Leu Asp Glu His Phe Ile Ile Asp Leu
 His Pro Glu His Ser Asn Val Val Ile Ala
 Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 Ser Ser Gly Val Gly Glu Val Leu Ser Gln
 Leu Ala Leu Thr Gly Lys Thr Glu His Asp
 Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala
 Leu Lys Glu Ser Leu Gln Lys Thr Thr Ile

— B

wobei A für einen Aminosäurerest oder ein Wasserstoffatom steht und B einen Aminosäurerest oder —OH bedeutet.

11. Verfahren zur Herstellung einer Sarcosinoxidase, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte:

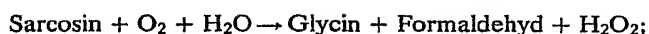
Einführung einer rekombinanten DNA, welche erzeugt wurde durch Einsetzen der in Anspruch 1 definierten Polydesoxyribonucleinsäure in einen Expressionsvektor, in einen Wirts-Mikroorganismus, um so einen Transformanten zu erzeugen,

Kultivierung des Transformanten, um zu bewirken, daß der Transformant die genetische Information der Polydesoxyribonucleinsäure weitergibt, und

Sammlung des Polypeptids, welches einen Bestandteil der Sarcosinoxidase darstellt;

wobei die Sarcosinoxidase folgende physikochemische Eigenschaften aufweist:

(a) Wirkung: katalysiert eine enzymatische Reaktion, bei der jeweils 1 Mol Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid aus jeweils 1 Mol Sarcosin, Sauerstoff und Wasser gemäß dem folgenden Reaktionsschema gebildet wird:



(b) Substratspezifität: zeigt eine Substratspezifität gegenüber Sarcosin;

(c) optimaler pH: 8,0 bis 9,5;

(d) isoelektrischer Punkt: $4,7 \pm 0,1$;

(e) Molekulargewicht (bestimmt nach der Gelfiltrations-Methode): $40\,000 \pm 4000$;

(f) thermische Stabilität: stabil nach Behandlung bei 40°C während 10 Minuten.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Polydesoxyribonucleinsäure die in Anspruch 2 definierte Polydesoxyribonucleinsäure ist.
 13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polydesoxyribonucleinsäure die in Anspruch 3 definierte Polydesoxyribonucleinsäure ist.
 14. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei der Transformant *Escherichia coli* DHI pOXI103 ist (hinterlegt bei Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology; Hinterlegungsnummer 1828, FERM BP-1828).

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Polydesoxyribonucleinsäure mit einer genetischen Information einer neuen Sarcosinoxidase.

Die Erfindung betrifft ferner einen Transformanten, der diese Polydesoxyribonucleinsäure aufweist, sowie die Sarcosinoxidase und ein Verfahren zur Herstellung derselben durch Expression mittels des Transformanten der genetischen Information der genannten Polydesoxyribonucleinsäure.

Sarcosinoxidase ist ein Enzym, welches eine enzymatische Reaktion katalysiert, bei der jeweils ein Mol Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid erzeugt werden aus jeweils einem Mol Sarcosin, Sauerstoff und Wasser gemäß dem folgenden Reaktionsschema:



Von Sarcosinoxidase ist es seit langem bekannt, daß sie natürlich vorkommt, speziell in tierischen Organen. Es wurde auch berichtet, daß diese Substanz in Mikroorganismen existiert, welche zur Gattung *Penicillium* [Frisell, W. R. & Mackenzie, C. G. (1970) *Meth. Enzymol.* 17A, 976—981], *Pseudomonas* (ibid.), *Arthrobacter* (JP-OS 28 893/1979), *Bacillus* (JP-OS 52 789/1979 und 1 62 174/1986), *Cylindrocarpum* (JP-OS 92 790/1981), *Pseudomonas* (JP-OS 43 379/1985) und dem Stamm von *Streptomycetaceae* (JP-OS 2 80 271/1986) gehören.

Da es sich bei Sarcosinoxidase um eine Oxidase handelt, welche Sarcosin als ihr Substrat aufweist, kann sie für die quantitative Bestimmung des Sarcosins verwendet werden, welches in einer Körperflüssigkeit, wie im Serum, vorliegt. Zusätzlich ist das Enzym in einem Creatinin- oder Cholin-Metabolismus involviert. Speziell führt die Konjugationsreaktion von Sarcosinoxidase mit Creatininase oder Creatinase, die im Creatinin-Metabolismussystem anwesend ist, zur Bildung von Formaldehyd und Wasserstoffperoxid und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung von Creatinin oder Creatin in spezifischer Weise mit großer Leichtigkeit. Mit Sarcosinoxidase wird somit ein biologisches Verfahren zur quantitativen Analyse eines Creatinins und/oder Creatins zur Verfügung gestellt. Die Substanz ist somit nicht nur bei Laborexperimenten von Bedeutung, sondern auch bei klinischen Diagnoseverfahren.

Sarcosinoxidase erzeugende Mikroorganismen, über die früher berichtet wurde, haben nur eine geringe Effizienz bei der Sarcosinoxidase-Erzeugung. Daher war die Verwendung einer Substanz, welche dazu beitragen kann, die Bildung von Sarcosinoxidase zu induzieren, wie Cholin, Sarcosin, Creatin oder dergl., unverzichtbar. Diese Maßnahme führt jedoch zu einer Kostensteigerung bei der Sarcosinoxidase-Erzeugung. Ferner gestaltet sich bei diesem Verfahren die Entfernung von anderen Enzymtypen, welche zusammen mit Sarcosinoxidase in dem kultivierten Gemisch vorliegen können, als äußerst schwierig. Es war somit ein kostenintensives Reinigungsverfahren erforderlich, um eine hochreine Sarcosinoxidase zu erhalten. Die Verwendung dieser Sarcosinoxidase erzeugenden Mikroorganismen hat sich somit nicht immer als effektiver und bequemer Weg zur Bereitstellung von Sarcosinoxidase als Reagens für den unbeschränkten Einsatz bei Laborexperimenten oder bei klinischen Diagnoseverfahren herausgestellt.

In einer kürzlich erschienenen Literaturstelle wird berichtet, daß kontaminierende Enzyme, wie Catalase und Uricase, welche in einer thermisch resistenten Sarcosinoxidase vorliegen, welche von einem thermisch resistenten Mikroorganismus stammt, vollständig deaktiviert werden können durch eine Hitzebehandlung der Sarcosinoxidase (JP-OS 1 62 174/1986). Derartige kontaminierende Enzyme, wie Catalase und Uricase, die aus thermisch resistenten Mikroorganismen stammen, sind jedoch mehr oder weniger thermisch resistent, und es ist in der Tat äußerst schwierig, diese kontaminierenden Enzyme vollständig zu eliminieren.

Von den Erfindern wurden umfangreiche Studien mit dem Ziel durchgeführt, die Produktivität der Sarcosinoxidase zu verbessern, ein Verfahren zu finden, mit dem fremde, kontaminierende Enzyme eliminiert werden können, und die Produktionskosten zu reduzieren. Als Ergebnis dieser Untersuchungen ist es den Erfindern gelungen, ein neues Sarcosinoxidase-Gen aus einem Mikroorganismus zu erhalten und ferner dessen Primärstrukturanalyse aufzuklären. Darüber hinaus haben die Erfinder unter Anwendung von Genetic Engineering Techniken ein Verfahren entwickelt, mit dem die Sarcosinoxidase mit hoher Produktivität hergestellt werden kann, ohne daß die Verwendung einer induzierenden Substanz in dem Kulturmedium erforderlich ist.

Es ist somit Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Polydesoxyribonucleinsäure zu schaffen, die eine Basensequenz umfaßt, die für eine Aminosäuresequenz eines Polypeptids codiert, welches eine Sarcosinoxidase darstellt, die folgende physikochemische Eigenschaften aufweist:

(a) Wirkung: katalysiert eine enzymatische Reaktion, bei der jeweils 1 Mol Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid gebildet wird aus jeweils 1 Mol Sarcosin, Sauerstoff und Wasser gemäß dem folgenden Reaktionsschema:



- (b) Substratspezifität: zeigt eine Substratspezifität gegenüber Sarcosin.
- (c) Optimaler pH: 8,0 bis 9,5.
- (d) Isoelektrischer Punkt: $4,7 \pm 0,1$.
- (e) Molekulargewicht (bestimmt nach dem Gelfiltrationsverfahren): $40\,000 \pm 4000$.
- (f) Thermische Stabilität: stabil bei Behandlung bei 40°C während 10 min.

5

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Schaffung eines Transformanten, dessen Wirts-Mikroorganismen die erwähnte, spezifische Polydesoxyribonucleinsäure besitzen.

Es ist ferner Aufgabe der Erfindung, eine Sarcosinoxidase zu schaffen, die von diesem Transformanten gebildet wurde.

10

Erfindungsgemäß wird ferner ein Verfahren zur Herstellung einer Sarcosinoxidase geschaffen, umfassend die Kultivierung des Transformanten unter Bewirkung des Transformanten, die genetische Information der erwähnten Polydesoxyribonucleinsäure weiterzugeben, und Sammlung des Polypeptids, welches einen Bestandteil der Sarcosinoxidase darstellt.

Weitere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung deutlich. In den Figuren zeigt

15

Fig. 1 eine schematische Zeichnung, in der der Aufbau des pOXI101-Vektors dargestellt ist;

Fig. 2 eine ähnliche Zeichnung für den pOXI103-Vektor;

Fig. 3-1 und 3-2 die Basensequenz der Sarcosinoxidase-Gen-DNA (von 5' bis 3') und

Fig. 4-1 und 4-2 die Aminosäuresequenz des daraus gebildeten Translationsprodukts.

20

Die Sarcosinoxidase der vorliegenden Erfindung besitzt als weitere enzymatische Aktivität eine Catalaseaktivität von unter 0,05 Einheiten, eine Creatinaseaktivität von unter 0,0004 Einheiten und einen N-Ethylglycinoxidaseaktivität von unter 0,03 Einheiten pro Einheit Aktivität der Sarcosinoxidase. Das Polypeptid, welches diese Sarcosinoxidase aufbaut, hat eine Aminosäuresequenz, welche, beginnend vom N-terminalen Ende, die folgende Formel (I) aufweist:

25

30

35

40

45

50

55

60

65

A - Ser Thr His Phe Asp Val Ile Val Val
 10
 Gly Ala Gly Ser Met Gly Met Ala Ala Gly
 20
 Tyr Gln Leu Ala Lys Gln Gly Val Lys Thr
 30
 Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Pro Pro His
 40
 Thr Asn Gly Ser His His Gly Asp Thr Arg
 50
 Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg
 60
 Glu Tyr Val Pro Leu Ala Leu Arg Ser Gln
 70
 Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Thr
 80
 His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val
 90
 Leu Val Phe Gly Pro Lys Gly Glu Ser Ala
 100
 Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
 110
 Glu His Ser Leu Thr Val Asp Leu Leu Glu
 120
 Gly Asp Glu Ile Asn Lys Arg Trp Pro Gly
 130
 Ile Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile
 140
 Phe Glu Pro Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser
 150
 Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg Glu Leu
 160
 Ala Glu Ala Arg Gly Ala Lys Val Leu Thr
 170
 His Thr Arg Val Glu Asp Phe Asp Ile Ser
 180
 Pro Asp Ser Val Lys Ile Glu Thr Ala Asn
 190
 Gly Ser Tyr Thr Ala Asp Lys Leu Ile Val
 200
 Ser Met Gly Ala Trp Asn Ser Lys Leu Leu

210		
Ser	Lys Leu Asn Leu Asp Ile Pro Leu Gln	
220		
Pro	Tyr Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu	5
230		
Ser	Asp Glu Ser Lys Tyr Ser Asn Asp Ile	
240		
Asp	Phe Pro Gly Phe Met Val Glu Val Pro	10
250		
Asn	Gly Ile Tyr Tyr Gly Phe Pro Ser Phe	
260		
Gly	Gly Cys Gly Leu Lys Leu Gly Tyr His	15
270		
Thr	Phe Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr	
280		
Ile	Asn Arg Glu Phe Gly Val Tyr Pro Glu	20
290		
Asp	Glu Ser Asn Leu Arg Ala Phe Leu Glu	
300		
Glu	Tyr Met Pro Gly Ala Asn Gly Glu Leu	25
310		
Lys	Arg Gly Ala Val Cys Met Tyr Thr Lys	
320		
Thr	Leu Asp Glu His Phe Ile Ile Asp Leu	30
330		
His	Pro Glu His Ser Asn Val Val Ile Ala	
340		
Ala	Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe	35
350		
Ser	Ser Gly Val Gly Glu Val Leu Ser Gln	
360		
Leu	Ala Leu Thr Gly Lys Thr Glu His Asp	40
370		
Ile	Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala	
380		
Leu	Lys Glu Ser Leu Gln Lys Thr Thr Ile	45
		50

— B (I)

wobei A für einen Aminosäurerest oder ein Wasserstoffatom steht und B einen Aminosäurerest oder —OH bedeutet. 55

In dem Polypeptid der Formel (I) kann der Aminosäurerest, der durch A dargestellt wird, ein oder mehrere Aminosäurereste sein. Bevorzugte Beispiele für A sind ein Wasserstoffatom, ein Methionin oder ein Signal-Polypeptid. Die durch B repräsentierte Gruppe kann entweder ein Säureamid oder ein oder mehrere Aminosäurereste sein. 60

Eine Polydesoxyribonucleinsäure, die ein Sarcosinoxidase-Gen darstellt, das die oben erwähnten physikochemischen Eigenschaften aufweist, kann eine beliebige Polydesoxyribonucleinsäure sein, solange dieselbe nur das Sarcosinoxidase-Gen per se enthält, welches die oben erwähnten physikochemischen Charakteristika besitzt. Als Beispiel dieses Sarcosinoxidase-Gens per se sei eine Polydesoxyribonucleinsäure erwähnt mit einer Basensequenz, die für die Aminosäuresequenz der folgenden Formel (II) codiert, beginnend von dem N-terminalen Ende: 65

OS 38 27 168

Ser Thr His Phe Asp Val Ile Val Val
 10
 Gly Ala Gly Ser Met Gly Met Ala Ala Gly
 20
 Tyr Gln Leu Ala Lys Gln Gly Val Lys Thr
 30
 Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Pro Pro His
 40
 Thr Asn Gly Ser His His Gly Asp Thr Arg
 50
 Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg
 60
 Glu Tyr Val Pro Leu Ala Leu Arg Ser Gln
 70
 Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Thr
 80
 His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val
 90
 Leu Val Phe Gly Pro Lys Gly Glu Ser Ala

100
Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
110
Glu His Ser Leu Thr Val Asp Leu Leu Glu
120
Gly Asp Glu Ile Asn Lys Arg Trp Pro Gly
130
Ile Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile
140
Phe Glu Pro Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser
150
Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg Glu Leu
160
Ala Glu Ala Arg Gly Ala Lys Val Leu Thr
170
His Thr Arg Val Glu Asp Phe Asp Ile Ser
180
Pro Asp Ser Val Lys Ile Glu Thr Ala Asn
190
Gly Ser Tyr Thr Ala Asp Lys Leu Ile Val
200
Ser Met Gly Ala Trp Asn Ser Lys Leu Leu
210
Ser Lys Leu Asn Leu Asp Ile Pro Leu Gln
220
Pro Tyr Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu
230
Ser Asp Glu Ser Lys Tyr Ser Asn Asp Ile
240
Asp Phe Pro Gly Phe Met Val Glu Val Pro
250
Asn Gly Ile Tyr Tyr Gly Phe Pro Ser Phe
260
Gly Gly Cys Gly Leu Lys Leu Gly Tyr His
270
Thr Phe Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr
280
Ile Asn Arg Glu Phe Gly Val Tyr Pro Glu
290
Asp Glu Ser Asn Leu Arg Ala Phe Leu Glu
300
Glu Tyr Met Pro Gly Ala Asn Gly Glu Leu
310
Lys Arg Gly Ala Val Cys Met Tyr Thr Lys

320
 Thr Leu Asp Glu His Phe Ile Ile Asp Leu
 330
 5 His Pro Glu His Ser Asn Val Val Ile Ala
 340
 Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 350
 10 Ser Ser Gly Val Gly Glu Val Leu Ser Gln
 360
 Leu Ala Leu Thr Gly Lys Thr Glu His Asp
 370
 15 Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala
 380
 Leu Lys Glu Ser Leu Gln Lys Thr Thr Ile
 20

(II)

25 Unter Berücksichtigung der Aminosäuresequenz des Polypeptids, das die Sarcosinoxidase der Formel (II) aufbaut, kann es sich bei der Polydesoxyribonucleinsäure um eine beliebige Polydesoxyribonucleinsäure handeln, solange diese nur ein beliebiges Codon unter einer Serie von Codons besitzt, das der jeweiligen der Aminosäuren entspricht, welche die Aminosäuresequenz der Formel (II) darstellen. Es kann sich auch um eine
 30 Polydesoxyribonucleinsäure handeln, welche an ihrem 5'-Ende ein oder mehrere Codons mit Ausnahme eines Nonsenscodons und/oder an ihrem 3'-Ende ein oder mehrere Codons aufweist. Ein typisches Beispiel einer solchen Polydesoxyribonucleinsäure ist eine solche mit einer Basensequenz, welche, beginnend vom 5'-Ende, die folgende Formel (III) hat:

35 X — AGC ACA CAT TTT GAT GTC ATC GTT GTT
 30
 GGA GCT GGA TCA ATG GGA ATG GCG GCA GGT
 40 60
 TAT CAA TTA GCA AAG CAA GGA GTC AAA ACA
 90
 TTA TTA GTG GAT GCA TTT GAT CCG CCG CAT
 45
 50
 55
 60
 65

120
ACA AAC GGA AGC CAT CAC GGT GAT ACT CGT
150
ATC ATC CGC CAT GCT TAC GGT GAG GGA AGA
180
GAA TAT GTT CQT CTT GCA TTA AGA TCA CAA
210
GAG TTA TGG TAT GAA CTA GAA AAA GAA ACA
240
CAC CAT AAA ATA TTC ACG AAA ACG GGC GTA
270
CTC GTA TTT GGT CCT AAA GGT GAA TCG GCT
300
TTC GTT GCA GAA ACG ATG GAA GCG GCA AAG
330
GAA CAT TCA TTG ACT GTT GAT TTA CTG GAA
360
GGT GAT GAA ATA AAT AAG CGT TGG CCG GGT
390
ATA ACG GTT CCG GAA AAC TAC AAT GCT ATT
420
TTC GAA CCG AAC TCA GGT GTA TTA TTC AGT
450
GAA AAT TGT ATT CGT GCC TAC CGC GAG TTA
480
GCT GAA GCG CGA GGT GCT AAA GTT CTA ACA
510
CAT ACA CGC GTT GAG GAC TTT GAC ATT TCA
540
CCG GAC TCA GTC AAA ATC GAA ACA GCA AAT
570
GGA TCA TAC ACA GCT GAT AAA TTA ATT GTT
600
AGC ATG GGA GCT TGG AAT AGC AAA CTA CTT
630
TCA AAA CTA AAT CTT GAC ATC CCA TTA CAG
660
CCA TAT CGT CAA GTG GTA GGT TTC TTT GAA
690
TCC GAT GAA TCA AAG TAT AGC AAT GAT ATT
720
GAT TTC CCA GGA TTC ATG GTT GAA GTG CCA
750
AAT GGT ATT TAT TAC GGA TTC CCA AGC TTC
780
GGC GGC TGT GGA TTG AAA CTA GGA TAT CAT

810
 ACG TTC GGG CAG AAA ATT GAC CCT GAT ACA
 840
 ATT AAT CGC GAA TTT GGC GTT TAT CCA GAA
 870
 GAT GAA AGT AAT CTT CGC GCT TTC TTG GAA
 900
 GAA TAT ATG CCA GGA GCA AAT GGA GAG TTA
 930
 AAA AGA GGG GCA GTC TGC ATG TAC ACG AAA
 960
 ACA TTA GAT GAA CAT TTC ATT ATA GAC TTA
 990
 CAT CCT GAA CAT TCC AAC GTA GTC ATC GCT
 1020
 GCC GGC TTC TCT GGC CAT GGA TTT AAG TTT
 1050
 TCC AGT GGA GTT GGT GAA GTG CTA AGT CAA
 1080
 TTA GCT TTA ACT GGT AAA ACA GAG CAC GAT
 1110
 ATT TCA ATC TTC TCC ATT AAC CGT CCT GCT
 1140
 TTG AAA GAA TCG TTA CAA AAA ACA ACT ATC
 - Y (III)

wobei X für ein Codon mit Ausnahme von TAA, TAG und TGA oder ein für ein Wasserstoffatom steht und Y ein Codon oder ein Wasserstoffatom darstellt.

Bei der Basensequenz der Formel (III) kann es sich bei dem durch X dargestellten Codon um ein beliebiges Codon handeln, solange dasselbe nur für eine Aminosäure codiert. Zusätzlich kann X an seinem 5'-Ende ein oder mehrere Codons besitzen, welche für Aminosäuren codieren. Bevorzugte Beispiele für X sind ATG oder eine Polydesoxyribonucleinsäure, welche einem Signal-Peptid entspricht.

Das durch Y dargestellte Codon kann ein beliebiges Codon sein, ausgewählt unter Translationsstopp-Codons und Codons, welche für eine Aminosäure codieren. Y kann an seinem 3'-Ende ein oder mehrere Codons besitzen, welche für Aminosäuren codieren, wobei es in diesem Fall wünschenswert ist, daß am 3'-Ende dieser Codons ein Translationsstopp-Codon vorgesehen ist.

Eine Polydesoxyribonucleinsäure mit einem Sarcosinoxidase-Gen als ihrem Bestandteil, eine Polydesoxyribonucleinsäure, welche ein Gen mit einer Basensequenz aufweist die für eine Aminosäuresequenz der Formel (II) codiert, oder eine Polydesoxyribonucleinsäure der Formel (III) kann man leicht herstellen mittels eines Mikroorganismus, welcher einen Donor des Sarcosinoxidase erzeugenden Gens darstellt. Speziell umfaßt dieses Verfahren die folgenden Verfahrensstufen. Eine DNA dieses Mikroorganismus wird zunächst abgetrennt und gereinigt. Anschließend erfolgt eine Behandlung mit Ultraschallwellen oder mit einer Restriktionsendonuclease. Diese DNA und eine lineare Expressionsvektor-DNA, welche in ähnlicher Weise verdaut wurde, z. B. durch eine Restriktionsendonuclease, werden mit einer DNA-Ligase oder dergl. verbunden (an den abgestumpften oder kohäsiven Enden der beiden DNA's), um einen geschlossenen Kreis zu bilden. Der auf diese Weise erhaltene, rekombinante DNA-Vektor wird in einen reproduzierbaren Wirts-Mikroorganismus eingeführt. Die Mikroorganismen, welche diesen rekombinanten DNA-Vektor aufweisen und die mittels eines Screening-Verfahrens unter Verwendung des Vektormarkers und der Sarcosinoxidase-Aktivität als Indikatoren gesammelt wurden, werden kultiviert. Der rekombinante DNA-Vektor wird dann von den kultivierten Mikroorganismen abgetrennt und gereinigt. Daraus wird die Sarcosinoxidase-Gen-Polydesoxyribonucleinsäure gesammelt.

Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung können beliebige Sarcosinoxidase erzeugende Mikroorganismen verwendet werden, welche in der Lage sind, Sarcosinoxidase mit den vorstehend erwähnten physikochemischen Eigenschaften zu erzeugen. Als Beispiel sei *Bacillus* sp. B-0618-Stamm genannt, der in JP-OS 28 893/1979 beschrieben wurde.

Ein transformierter Mikroorganismus, dem die Sarcosinoxidase erzeugende Fähigkeit unter Verwendung von Genetic Engineering Techniken verliehen wurde, kann ebenfalls als ein Sarcosinoxidase-Gen-Donator-Mikroorganismus verwendet werden.

Das Verfahren der Sammlung einer DNA, welche durch den Gen-Donator-Mikroorganismus induziert wurde, wird im folgenden beispielhaft erläutert. Ein beliebiger der oben erwähnten Gen-Donator-Mikroorganismen wird zunächst in einem flüssigen Kulturmedium unter Belüftung 1 bis 3 Tage kultiviert. Die kultivierte Brühe wird zentrifugiert, um die Mikroorganismen zu sammeln. Diese werden dann zur Erzeugung einer Bacteriolyse lysiert, enthaltend ein Sarcosinoxidase-Gen. Für die Bacteriolyse wird eine Behandlung mit einem die Zellwand lysierenden Enzym, wie Lysozym oder β -Glucanase, durchgeführt. Gegebenenfalls erfolgt diese Behandlung in Kombination mit einem anderen Enzym, wie Protease, oder einem oberflächenaktiven Mittel, wie Natriumlaurylsulfat. Zusätzlich kann neben der Bacteriolyse eine physikalische Verdauung der Zellwände durchgeführt werden, z. B. durch Einfrieren-Auftauen oder mittels einer französischen Presse.

Herkömmliche Verfahren der Reinigung umfassen beispielsweise eine Deproteinbehandlung durch Phenolextraktion, Proteasebehandlung, Ribonucleasebehandlung, Präzipitation aus Alkohol und Zentrifugieren und können entweder unabhängig oder in Kombination angewandt werden, um eine Abtrennung und Reinigung der DNA aus der Bacteriolyse zu erreichen.

Die Verdauung der auf diese Weise abgetrennten und gereinigten DNA des Mikroorganismus kann beispielsweise durchgeführt werden mittels einer Behandlung mit Ultraschallwellen oder eine Restriktionsendonuclease. Um eine leichte Verbindung der DNA-Fragmente und der Vektor-DNA zu gewährleisten, ist jedoch die Verwendung einer Restriktionsendonuclease bevorzugt, speziell einer solchen mit einer Aktivität für eine spezifische Nucleotidsequenz, wie EcoR I, Hind III, BamH I oder BamH II.

Geeignete Vektoren für den Einsatz bei der Erfindung sind solche, welche für die Verwendung als genetische, rekombinante DNA durch künstliche Behandlung eines Phagen oder einer Plasmid-DNA rekonstruiert wurden und in der Lage sind, autonom in Wirtsbakterienzellen zu wachsen.

Falls *Escherichia coli* als Wirts-Mikroorganismus verwendet wird, werden beispielsweise γ gt · γ C, γ gt · γ B oder dergl. als Phagen verwendet.

Als Plasmid werden pBR325, pACYC184, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19 oder dergl. verwendet, falls *Escherichia coli* der Wirts-Mikroorganismus ist, und pUB110, pC194 oder dergl. werden verwendet, falls *Bacillus subtilis* der Wirts-Mikroorganismus ist. Zusätzlich kann man Suttlevektoren einsetzen, welche autonom in Wirtsbakterienzellen wachsen können, und zwar in grampositiven oder gramnegativen Mikroorganismen oder in beiden, z. B. bei *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Diese Vektoren werden vorteilhafterweise zu Vektorfragmenten verdaut unter Verwendung der gleichen Restriktionsendonuclease wie derjenigen, die zum Aufbrechen der oben erwähnten Sarcosinoxidase-Gen-Donator-Mikroorganismus-DNA verwendet wurde.

Herkömmliche Verfahren der Verwendung von DNA-Ligase können eingesetzt werden, um die bakterielle DNA und das Vektorfragment zu vereinigen. Beispielsweise kann das kohäsive Ende der bakteriellen DNA und das des Vektorfragments zunächst getempert (annealed) werden und nachfolgend kann eine rekombinante DNA aus dem bakteriellen DNA-Fragment und dem Vektorfragment durch die Wirkung einer geeigneten DNA-Ligase hergestellt werden. Falls erforderlich, kann das getemperte bakterielle DNA-Vektor-Fragment in den Wirts-Mikroorganismus eingeführt werden, um die rekombinante DNA mit Hilfe einer in vivo-DNA-Ligase zu erzeugen.

Als Wirtsbakterien kann man beliebige Mikroorganismen verwenden, welche ein autonomes und stabiles Wachstum der rekombinanten DNA erlauben und die Fähigkeit zur Expression des Charakters der fremden DNA besitzen. Beispiele derartiger Mikroorganismen umfassen *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* C600 und dergl., falls *Escherichia coli* als Wirtsbakterium verwendet wird.

Die Einführung der rekombinanten DNA in den Wirts-Mikroorganismus kann in Gegenwart von Calciumionen durchgeführt werden, wenn der Wirts-Mikroorganismus ein Bakterium der Gattung *Escherichia* ist. Falls man ein Bakterium der Gattung *Bacillus* als Wirts-Mikroorganismus einsetzt, so kann man entweder die kompetente Zellmethode, ein Verfahren zur elektrischen Einführung der Ribosom-Rekombinant-DNA in die Protoplast-Wirtsbakterienzellen oder die Mikroinjektionsmethode verwenden. Es wurde festgestellt, daß die auf diese Weise hergestellten Transformant-Bakterien bei Kultivierung in einem Nährmedium in stabiler Weise große Mengen Sarcosinoxidase erzeugen.

Die Einführung der zweckdienlichen DNA in den Wirts-Mikroorganismus kann verfolgt werden, indem man den Mikroorganismus ermittelt, der zur Expression eines Drogenresistenzmarkers des Vektors, auf dem die zweckdienliche, rekombinante DNA gehalten wird, in der Lage ist sowie gleichzeitig zur Expression von Sarcosinoxidase. Man kann beispielsweise diejenigen Bakterien selektieren, welche in einem selektiven Kulturmedium des chemischen Toleranzmarkers wachsen und Sarcosinoxidase erzeugen.

Die rekombinante DNA, welche das Sarcosinoxidase-Gen besitzt und einmal auf diese Weise ausgewählt wurde, kann leicht von dem Transformant-Mikroorganismus extrahiert werden für die Einführung in ein weiteres Wirtsbakterium. Alternativ kann man die Sarcosinoxidase-Gen-DNA unter Verwendung einer Restriktionsendonuclease oder dergl. aus einer rekombinanten DNA, welche ein Sarcosinoxidase-Gen besitzt, verdauen und mit einem Ende eines anderen geöffneten Vektors vereinigen, der auf ähnliche Weise erhalten wurde. Die rekombinante DNA mit neuen Eigenschaften, welche auf diese Weise hergestellt wurde, wird anschließend in den Wirts-Mikroorganismus eingeführt.

Eine Sarcosinoxidase-Mutein-DNA, die eine wesentliche Sarcosinoxidase-Aktivität besitzt, ist eine Genvariante, die durch Genetic Engineering Techniken erfindungsgemäß aus einem Sarcosinoxidase-Gen erzeugt wurde. Dieses Mutein kann mittels verschiedener Genetic Engineering Techniken hergestellt werden, wie der ortsspezifischen Basenkonversionsmethode, der Substitution eines spezifischen DNA-Fragments mit einem künstlichen Variant-Gen und dergl. Unter den so hergestellten Sarcosinoxidase-Mutein-DNA's werden diejenigen, welche besonders ausgezeichnete Eigenschaften aufweisen, schließlich in einen Vektor eingesetzt zur Erzeugung einer rekombinanten DNA, welche dann in den Wirts-Mikroorganismus eingeführt wird. Nachfol-

gend kann das Sarcosinoxidase-Mutein hergestellt werden.

Die Basensequenz des nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellten Sarcosinoxidase-Gens wurde mit der Desoxy-Methode entschlüsselt [Science, 214, 1205-1210 (1981)]. Die Aminosäuresequenz von Sarcosinoxidase wurde basierend auf der Basensequenz bestimmt.

5 Im folgenden wird die Methode erläutert, welche zur Bestimmung der Aminosäuresequenz des Abschnitts angewandt wurde, der das N-Ende des Sarcosinoxidase-Peptids darstellt. Der Sarcosinoxidase-Gen-Donator-Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Erzeugung von Sarcosinoxidase wird zunächst in einem Nährmedium kultiviert, um Sarcosinoxidase in den Bakterien zu bilden und anzureichern. Die kultivierten Bakterien werden von der Brühe durch Filtration, Zentrifugieren oder ähnliche Verfahren gesammelt. Die gesammelten Bakterien werden dann verdaut, und zwar entweder mechanisch oder enzymatisch unter Verwendung von Lysozym oder dergl., und zu den verdauten Bakterien gibt man EDTA und/oder ein geeignetes oberflächenaktives Mittel, 10 sofern erforderlich, um Sarcosinoxidase zu solubilisieren. Diese wird anschließend als wäßrige Lösung abgetrennt. Diese wäßrige Lösung der Sarcosinoxidase wird eingeengt oder ohne Einengung der Ammoniumsulfat-Fraktionierung, Gelfiltration, Adsorptionschromatographie oder Ionenaustausch-Chromatographie unterworfen, um hochreine Sarcosinoxidase zu erhalten. Die Aminosäuresequenz des des Abschnitts, welcher das N-Ende des Sarcosinoxidase-Peptids darstellt, wird an dieser hochreinen Sarcosinoxidase bestimmt unter Verwendung eines Flüssigphasen-Proteinsequenz-Analysegeräts (Beckman System 890ME, hergestellt von Beckman, Inc.). Auf diese Weise wird festgestellt, daß die Aminosäuresequenz dieses Abschnitts identisch ist mit der N-terminalen Aminosäure-Sequenz von der Sarcosinoxidase, die durch eine Genetic Engineering Technik erhalten wurde.

20 Die Kultivierung des Transformant-Wirts-Mikroorganismus wird unter geeigneten Bedingungen durchgeführt, wobei die Nährstoffcharakteristika und die physiologischen Charakteristika des Wirts-Mikroorganismus berücksichtigt werden. In den meisten Fällen wird eine Flüssigkultivierung durchgeführt. Bei einer Produktion im industriellen Maßstab hat sich jedoch eine Kultivierung unter tiefen aeroben Rührbedingungen als vorteilhaft erwiesen. Eine breite Vielfalt von Nährstoffen, wie sie herkömmlicherweise für die Kultivierung von Bakterien verwendet werden, kann für die Kultivierung des Wirts-Mikroorganismus verwendet werden. Speziell kann man beliebige Nährstoff-Kohlenstoffverbindungen als Kohlenstoffquellen einsetzen, einschließlich beispielsweise Glucose, Saccharose, Lactose, Maltose, Fructose, Melassen und dergl. Als Stickstoffquellen kann man beliebige, verfügbare Stickstoffverbindungen einsetzen, einschließlich Peptone, Fleischextrakte, Hefeextrakte, Caseinhydrolysate und dergl. Andere Bestandteile einschließlich Salze, wie Phosphate, Carbonate und Sulfate, sowie 30 Salze von Magnesium, Calcium, Kalium, Eisen, Mangan, Zink und dergl. und bestimmte Typen von Aminosäuren oder Vitamine können verwendet werden, falls ihr Einsatz zweckmäßig ist. Bei dem Verfahren ist die Verwendung von Sarcosinoxidase-induzierenden Substanzen, wie Cholin, Sarcosin, Creatin und dergl., welche bei dem herkömmlichen Verfahren der Erzeugung von Sarcosinoxidase durch Sarcosinoxidase erzeugende Mikroorganismen erforderlich waren, nicht nötig.

35 Die Kultivierungstemperatur kann in einem Bereich variiert werden, in dem die Bakterien wachsen können und Sarcosinoxidase produzieren können. Der bevorzugte Temperaturbereich beträgt 20 bis 42°C für *Escherichia coli*. Die Kultivierungsdauer kann in einem gewissen Ausmaß in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen variiert werden. Grundsätzlich wird die Kultivierung zu einem Zeitpunkt beendet, wenn die Ausbeute an Sarcosinoxidase ein Maximum erreicht. Bei der gewöhnlichen Praxis dauert das etwa 12 bis 48 Stunden. Es ist 40 möglich, den pH dieser Kulturmedia in einem Bereich zu ändern, in dem die Bakterien wachsen und Sarcosinoxidase erzeugen können. Der speziell bevorzugte pH-Bereich ist etwa 6 bis 8.

Sarcosinoxidase kann für die Verwendung in Form der Kulturbrühe mit einem Gehalt der Bakterien aufbewahrt werden. Im allgemeinen wird jedoch die in der Kulturbrühe enthaltene Sarcosinoxidase verwendet, nachdem man die Bakterien durch Filtration, Zentrifugieren oder ähnliche Verfahren abgetrennt hat. Falls 45 Sarcosinoxidase in den Bakterienkörpern enthalten ist, werden die Bakterien zunächst mittels Filtration oder Zentrifugieren abgetrennt. Die gesammelten Bakterien werden anschließend verdaut, und zwar entweder durch mechanische Mittel oder durch enzymatische Mittel unter Verwendung von Lysozym oder dergl. Zu den verdauten Bakterien wird ein Chelatisierungsmittel, wie EDTA und/oder ein geeignetes oberflächenaktives Mittel, sofern erforderlich, gegeben, um Sarcosinoxidase zu solubilisieren. Sarcosinoxidase wird dann als wäßrige 50 Lösung gesammelt.

Die so erhaltenen, Sarcosinoxidase enthaltenden Lösungen werden anschließend durch Eindampfen im Vakuum oder unter Verwendung eines Filters eingeengt und einer Aussalzbehandlung mit Ammoniumsulfat, Natriumsulfat oder dergl. oder einer fraktionierten Fällung unter Verwendung eines hydrophilen, organischen Lösungsmittels, wie Methanol, Ethanol, Aceton oder dergl., unterworfen. Das Präzipitat wird in Wasser aufgelöst und die Lösung wird durch eine semipermeable Membran dialysiert, um niedermolekulargewichtige Verunreinigungen zu eliminieren. Als alternatives Verfahren kann man das Präzipitat mittels Gelfiltration, Adsorptionschromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie oder dergl. unter Verwendung eines Adsorptionsmittels oder eines Gelfiltrationsmittels, raffinieren. Gereinigte Sarcosinoxidase wird aus einer Sarcosinoxidase enthaltenden Lösung, welche unter Verwendung der verschiedenen Maßnahmen erhalten wurde, durch Verdampfung 60 im Vakuum, Gefriergetrocknung oder dergl. hergestellt.

Die Aktivität der so hergestellten Sarcosinoxidase wird nach dem folgenden Verfahren gemessen.

Zunächst wird eine Reaktionsflüssigkeit der folgenden Zusammensetzung hergestellt:

	ml	
0,2 Mol Tris-chlorwasserstoff-Puffer (pH 8,0)	0,5	
15 mMol 4-Aminoantipyrin	0,5	
0,2% (Gew./Vol.) Phenol	0,5	5
Peroxidase (0,5 E/ml)	0,5	
0,1 Mol Sarcosin-wäßrige Lösung	1,0	
Wasser	2,0	

In ein Reagenzglas gibt man 0,5 ml der obigen Reaktionsflüssigkeit. Die Flüssigkeit wird 3 min bei 37°C erhitzt und mit 10 µl einer Lösung mit einem Gehalt an Sarcosinoxidase (SOX) versetzt. Nachdem das Gemisch genau 5 min bei 37°C gehalten wurde, gibt man 2,5 ml Ethanol zu, um die Reaktion zu beenden. Das Gemisch wird dann einer colorimetrischen Analyse bei einer Wellenlänge von 480 nm unterworfen und der erhaltene Wert wird als A genommen. Wenn man die Fähigkeit der Substanz zur Erzeugung von 1 µMol Wasserstoffperoxid/min. als 1 Einheit (E) annimmt, errechnet sich der Wert für die Sarcosinoxidase-Aktivität (SOX-Aktivitätswert: E/ml) aus der folgenden Gleichung:

$$\text{SOX-Aktivität} = \frac{(A - A_0) \times 3,01 \times 1}{17,14 \times 0,05 \times 0,01 \times 5}$$

wobei A_0 den colorimetrischen Wert bezeichnet, der bei 480 nm erhalten wird, wenn die Pufferlösung ohne die Enzymlösung verwendet wird.

Die Aktivitäten der anderen Enzyme werden gemäß den folgenden Verfahren bestimmt.

(1) Messung der Catalase-Aktivität

In ein Reagenzglas gibt man 0,5 ml der mit 0,1 Mol Phosphatpuffer (pH 7,0) verdünnten Enzymlösung. Nach Erhitzen der Lösung während 5 min bei 30°C gibt man 0,5 ml 0,4%ige Wasserstoffperoxid-Lösung zu und hält das Ganze genau 5 min bei 30°C. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 2,5 ml 0,1 Mol Perchlorsäurelösung wird das Gemisch einer colorimetrischen Analyse unterworfen. Der erhaltene Wert wird als B bezeichnet. Gesondert werden 0,5 ml der 0,4%igen Wasserstoffperoxidlösung in ein Reagenzglas gefüllt und 5 min bei 30°C erhitzt. Dazu gibt man 2,5 ml 0,1 Mol Perchlorsäurelösung und dann 0,5 ml der mit 0,1 Mol Phosphatpuffer (pH 7,0) verdünnten Enzymlösung. Das Gemisch wird bei 240 nm der colorimetrischen Analyse unterworfen und der erhaltene Wert wird als B_0 bezeichnet. Wenn man die Fähigkeit der Substanz zur Erzeugung von 1 µMol Wasserstoffperoxid/min als 1 Einheit (E) annimmt, errechnet sich der Wert für die Catalase-Aktivität (CL-Aktivitätswert: E/ml) aus der folgenden Gleichung:

$$\text{CL-Aktivität} = \frac{(B - B_0) \times 3,50 \times 1}{0,04 \times 0,5 \times 5}$$

(2) Messung der Creatinase-Aktivität

Es werden zunächst drei Lösungen hergestellt:

Erste Lösung	ml	
0,2 Mol Phosphatpuffer (pH 7,5)	0,5	
50 mMol Creatin-wäßrige Lösung	4,5	50
Zweite Lösung:		
0,2 Mol Tris-Chlorwasserstoffsäurepuffer (pH 8)	0,5	
15 mMol 4-Aminoantipyrin-wäßrige Lösung	0,5	
0,2% Phenol	0,5	55
Peroxidase (50 E/ml)	1,0	
Sarcosinoxidase (30 E/ml)	0,5	
0,5 mMol p-Chlorquecksilberbenzol	2,0	
Dritte Lösung:		
0,5 mMol p-Chlorquecksilberbenzol	0,5	60

Die erste Lösung wird in ein Reagenzglas gefüllt und 3 min bei 37°C erhitzt. Dazu gibt man 10 µl einer Enzymlösung und hält das Ganze genau 5 min bei 37°C. Zu dem Gemisch gibt man 0,5 ml der dritten Lösung und danach 0,5 ml der zweiten Lösung. Nachdem dieses Gemisch weitere 20 min bei 37°C gehalten wurde, um die Reaktion zu bewirken, werden 1,5 ml destilliertes Wasser zugesetzt und die Lösung wird bei einer Wellenlänge von 500 nm der colorimetrischen Analyse unterworfen. Die Fähigkeit der Substanz zur Erzeugung von 1 µMol Wasserstoffperoxid in 1 min wird als die Aktivität von 1 Einheit (E) angenommen.

(3) Messung der N-Ethylglycinoxidase-Aktivität

Zunächst wird eine Reaktionsflüssigkeit der folgenden Zusammensetzung hergestellt:

5		ml
	0,2 Mol Tris-Chlorwasserstoff-Puffer (pH 8,0)	0,5
	15 mMol 4-Aminoantipyrin	0,5
	0,2% (Gew./Vol.) Phenol	0,5
10	Peroxidase (50 E/ml)	0,5
	1,0 Mol N-Ethylglycin-wäßrige Lösung	1,0
	Wasser	2,0

15 In ein Reagenzglas gibt man 0,5 ml der obigen Reaktionsflüssigkeit. Die Flüssigkeit wird 3 min bei 37°C erhitzt und mit 10 µl einer das Enzym enthaltenden Lösung versetzt. Nachdem man das Gemisch genau 5 min bei 37°C gehalten hat, gibt man 2,5 ml Ethanol zur Beendigung der Reaktion zu. Das Gemisch wird dann der colorimetrischen Analyse bei einer Wellenlänge von 480 nm unterworfen, und der dabei erhaltene Wert wird als A bezeichnet. Die Fähigkeit der Substanz zur Erzeugung von 1 µMol Wasserstoffperoxid/min wird als die Einheit (E) der Aktivität des Enzyms angenommen.

20 Basierend auf den obigen Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität findet man bei der Sarcosinoxidase der vorliegenden Erfindung eine Catalase-Aktivität von unter 0,05 Einheiten, eine Creatinase-Aktivität von unter 0,0004 Einheiten und eine N-Ethylglycinoxidase-Aktivität von unter 0,03 Einheiten pro Einheit der Aktivität von Sarcosinoxidase. Es wird somit deutlich, daß die Sarcosinoxidase ein Enzym mit einer äußerst hohen Spezifität ist und als Reagens für klinische Diagnoseverfahren brauchbar ist.

25 Die auf diese Weise hergestellte Sarcosinoxidase besitzt die folgenden physikochemischen Eigenschaften.

(a) Wirkung: Das Enzym katalysiert eine enzymatische Reaktion, bei der jeweils 1 Mol Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid aus jeweils 1 Mol Sarcosin, Sauerstoff und Wasser gemäß dem folgenden Reaktionsschema erzeugt wird:



35 (b) Substratspezifität: Die Sarcosinoxidase wird in einer Menge von 0,5 E zu 0,5 ml der Reaktionslösung gegeben, die 0,05 ml 0,2 M Tris-Chlorwasserstoffsäure-Puffer (pH 8,0), 0,05 ml 0,2%iges Phenol, 0,05 ml von 0,5 mg/ml Peroxidase, 0,2 ml destilliertes Wasser und 0,20 ml einer Substratlösung der folgenden Verbindung mit 0,5 Mol Konzentration umfaßt. Man läßt die Lösung 5 min bei 37°C reagieren. Anschließend werden 2,5 ml Ethanol zugesetzt, um die Reaktion zu beenden. Die resultierende Lösung wird bei 480 nm einer colorimetrischen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse, ausgedrückt als relative Aktivität des jeweiligen Substrats, sind nachstehend angegeben:

	Substrat	Relative Aktivität (%)
	Sarcosin	100,0
45	Cholin	0
	Serin	0
	Threonin	0
	Alanin	0
	Valin	0
50	N-Methylethanolamin	0
	N-Dimethylethanolamin	0

55 (c) Optimaler pH: Um den Einfluß des Enzyms auf das 4-Aminoantipyrin-Phenol-Peroxidase-Chromophorsystem zu vermeiden, wird das erzeugte Formaldehyd quantitativ bestimmt durch die Acetyl-Aceton-Methode. Dabei wurde festgestellt, daß der optimale pH-Bereich der Sarcosinoxidase in der Nähe von 8,0 bis 9,5 liegt. Die verwendeten Puffer waren Dimethylglutarsäure-Puffer (pH 4 bis 7), Phosphatpuffer (pH 6 bis 8), Tris-chlorwasserstoffsäure-Puffer (pH 7,5 bis 9), Glycin-Natriumhydroxid-Puffer (pH 9 bis 10) und Natriumcarbonat-Natriumborat-Puffer (pH 10 bis 11).

60 (d) Isoelektrischer Punkt: $4,7 \pm 0,1$ (Elektrophorese unter Verwendung von Träger-Ampholin).

(e) Molekulargewicht (bestimmt mit der Gelfiltrationsmethode): $40\,000 \pm 4000$.

(f) Thermische Stabilität: 0,5 ml 10 mMol Tris-chlorwasserstoffsäure-Puffer (pH 8,0), enthaltend 20 µg/ml des enzymatischen Proteins, werden bei einer konstanten Temperatur stehengelassen. Dann wird die enzymatische Aktivität der Lösung gegenüber Sarcosin gemessen gemäß dem oben beschriebenen Verfahren. Man stellt fest, daß die Lösung 100% Aktivität erhalten hat, selbst nach Behandlung bei 40°C.

65 (g) Optimale Temperatur: Die enzymatische Aktivität gegenüber Sarcosin wurde bei verschiedenen Temperaturen gemäß der oben beschriebenen Methode zur Bestimmung der Sarcosinoxidase-Aktivität gemessen.

sen. Dabei findet man, daß die optimale Temperatur in der Nähe von 50°C liegt.

(h) pH-Stabilität: Pufferlösungen des Enzyms mit unterschiedlichen pH-Werten werden hergestellt. Die verwendeten Puffer sind Dimethylglutarsäure-Puffer (pH 4 bis 7), Phosphatpuffer (pH 6 bis 8), Tris-chlorwasserstoffsäure-Puffer (pH 7,5 bis 9), Glycin-Natriumhydroxid-Puffer (pH 9 bis 10), Natriumcarbonat-Natriumborat-Puffer (pH 10 bis 11). Zu 0,1 ml des jeweiligen Puffers gibt man 100 µl der Enzymlösung (die enzymatische Proteinkonzentration beträgt 100 µg/ml) und läßt die Mischung 60 min bei 37°C stehen. Dann setzt man 0,3 ml 1,0 mMol Tris-chlorwasserstoffsäure-Puffer (pH 8,0) zur Einstellung des pH-Wertes zu. 20 µl eines Aliquots dieser Lösung gibt man zu der Reaktionsflüssigkeit, um deren enzymatische Aktivität gegenüber Sarcosin nach der oben beschriebenen Methode zu bestimmen. Dabei stellt man fest, daß in der Nähe von 6,0 bis 10,0 pH-Stabilität vorliegt.

In der vorliegenden Beschreibung werden Aminosäuren, Peptide, Nucleinsäuren und Nucleinsäure-verwandte Verbindungen gemäß den herkömmlichen Standards auf diesem Gebiet abgekürzt. Einige Beispiele der Abkürzungen sind nachstehend angegeben. Ferner beziehen sich alle Bezeichnungen der Aminosäuren auf die L-Isomeren.

DNA	= Desoxyribonucleinsäure
RNA	= Ribonucleinsäure
A	= Adenin
T	= Thymin
G	= Guanin
C	= Cytosin
Ala	= Alanin
Arg	= Arginin
Asn	= Asparagin
Asp	= Aspartat
Cys	= Cystein
Gln	= Glutamin
Glu	= Glutamat
Gly	= Glycin
His	= Histidin
Ile	= Isoleucin
Leu	= Leucin
Lys	= Lysin
Met	= Methionin
Phe	= Phenylalanin
Pro	= Prolin
Ser	= Serin
Thr	= Theronin
Trp	= Tryptophan
Tyr	= Tyrosin
Val	= Valin.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie zu beschränken.

Beispiele

Beispiel 1

(Herstellung von Chromosom-DNA)

Chromosom-DNA wird aus *Bacillus* sp. B-0618 (FERM BP-0750) nach dem folgenden Verfahren hergestellt. Der Stamm wird über Nacht in einem normalen Bouillon-Medium, enthaltend 0,5% Natriumthiosulfat, bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Die kultivierte Brühe wird 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert, um die Bakterien zu sammeln. Diese werden in 5 ml einer Lösung suspendiert, die 10% Saccharose, 50 mMol Tris-chlorwasserstoffsäure (pH 8,0) und 50 mMol EDTA enthält. Zu der Suspension gibt man 1 ml Lysozymlösung (10 mg/ml) und hält die Mischung 15 min bei 37°C. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 ml 10%igem SDS (Natriumdodecylsulfat). Ein gleiches Volumen einer Lösungsmittelmischung von Chloroform und Phenol (1 : 1) wird zu der Suspension gegeben und das Gemisch wird gerührt und 3 min bei 10 000 U/min zentrifugiert, um Wasser und Lösungsmittelschichten abzutrennen. Zu der zurückgewonnenen Wasserschicht gibt man vorsichtig das zweifache Volumen Ethanol und rührt das Gemisch langsam mit einem Glasstab, um zu bewirken, daß sich die DNA um den Stab wickelt. Die auf diese Weise abgetrennte DNA wird in 10 ml einer Lösung aufgelöst, die 10 mMol Tris-chlorwasserstoffsäure (pH 8,0) und 1 mMol EDTA enthält (eine derartige Lösung wird im folgenden als "TE" bezeichnet). Diese Lösung wird mit einem gleichen Volumen des Chloroform-Phenol (1 : 1)-Lösungsmittelgemisches behandelt und erneut zentrifugiert, um die Wasserschicht zu isolieren. Zu dieser gibt man das zweifache Volumen Ethanol, und die DNA wird wiederum auf die oben beschriebene Weise abgetrennt. Diese schließlich erhaltene DNA wird in 2 ml TE aufgelöst.

Beispiel 2

(Herstellung von pACYC 184-Plasmid-DNA)

- 5 *Escherichia coli* pM191, welches pACYC184 trägt [J. Bacteriol, 134, 1141 (1981); ATCC 37 033], wird in 1 l BHI-Medium (hergestellt von Difco Co.) unter Schütteln kultiviert. Wenn die Trübung der Brühe den Wert $OD_{660} = 1,0$ erreicht hat, wird Spectinomycin zugesetzt, so daß eine Endkonzentration der Brühe 300 µg/ml beträgt. Das Schütteln der Brühe bei 37°C wird mindestens 16 h fortgesetzt. Nach Beendigung der Kultivierung wird die Brühe 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert, um Bakterienzellen zu sammeln. Daraus wird die Plasmid-DNA nach der Lysozym-SDS-Methode und der Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Methode [Maniatis et al., Molecular Cloning, 86—94, Cold Spring Harbor (1982)] hergestellt.

Beispiel 3

[Aufbau von Plasmid pOXI101 mit Sarcosinoxidase(SOX)-Gen]

- 15 (1) Es wird eine Mischung hergestellt aus 2 µl (etwa 0,5 µg) *Bacillus* sp. B-0618-chromosomaler DNA, hergestellt in Beispiel 1), 1 µm einer 10fachen Konzentration EcoRI-Verdauungspuffer [500 mMol Tris-chlorwasserstoffsäure (pH 7,5), 70 mMol MgCl₂, 1 Mol NaCl und 70 mMol Mercaptoethanol], 1 µm EcoRI (10 Einheiten/µl; hergestellt von Takara Shuzo Co., Ltd.) und 6 µl Wasser. Die DNA wird 1 h bei 37°C verdaut. Gesondert wird 20 Plasmid pACYC 184-DNA (etwa 0,3 µg) mit EcoRI auf ähnliche Weise verdaut. Dazu gibt man 0,6 Einheiten alkalische Phosphatase (hergestellt von Takara Shuzo Co., Ltd.; im folgenden als "BAP" bezeichnet) und inkubiert das Gemisch 1 h bei 65°C. Die beiden Lösungen der EcoRI-verdauten DNAs, die auf diese Weise hergestellt wurden, werden miteinander vermischt und zu dem Gemisch gibt man 0,1 Vol. 3M Natriumacetat. Anschließend wird die Lösung mit einem gleichen Volumen einer Chloroform-Phenol-Lösungsmittelmischung behandelt und 25 zentrifugiert, um die Wasserschicht zurückzugewinnen. Dazu gibt man das zweifache Volumen Ethanol. Die DNA wird durch Zentrifugieren gefällt und im Vakuum getrocknet. Die getrocknete DNA wird in 89 µl Wasser aufgelöst. Dazu gibt man 10 µl der 10fachen Konzentration Ligationspuffer [0,5 Mol Tris-chlorwasserstoffsäure (pH 7,6), 0,1 Mol MgCl₂, 0,1 Mol Dithiothreitol, 10 mMol Spermidin, 10 mMol ATP] und 1 µl T4 DNA-Ligase (175 30 Einheiten/µl; hergestellt von Takara Shuzo Co., Ltd.) und vermischt das Ganze. Das Gemisch wird über Nacht bei 4°C stehengelassen. Diese DNA-Lösung wird mit einer Chloroform-Phenol-Mischung behandelt und die DNA wird durch Ethanol ausgefällt, im Vakuum getrocknet und in 10 µl TE aufgelöst.

- (2) *Escherichia coli* DH1 (Stamm Nr. ME8569; zur Verfügung gestellt von National Gene Research Institute) wird in 100 ml BHI-Medium (Brain Heart Infusion, hergestellt von Difco Co.) kultiviert, und die Zellen werden in 35 der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugieren (10 000 U/min. 2 min) gesammelt. Die Zellen werden in 40 ml einer eiskalten Lösung suspendiert, die 30 mMol Kaliumacetat, 100 mMol RbCl, 10 mMol CaCl₂, 50 mMol MnCl₂ und 15% Glycerin (pH 5,8) enthält. Nach 5minütigem Stehenlassen bei 0°C wird die Suspension zur Entfernung des Überstands zentrifugiert. Die Zellen werden in 4 ml einer eiskalten Lösung suspendiert, die 10 mMol MOPS-Puffer (hergestellt von Dotite Co.), 75 mMol CaCl₂, 10 mMol RbCl und 15% Glycerin (pH 6,5) 40 enthält. Die Suspension wird 15 min bei 0°C stehengelassen, um kompetente Zellen zu erhalten.

- (3) Zu 200 µl der obigen *Escherichia coli*-Suspension gibt man 10 µl der in der obigen Stufe (1) hergestellten DNA-Lösung. Die Mischung wird 30 min bei 0°C stehengelassen und dann mit 1 ml BHI-Medium versetzt. Dieses Gemisch wird 90 min bei 37°C gehalten, 100 µl Aliquot der Mischung wird auf einer BHI-Agarplatte mit einem Gehalt an Tetracyclin (15 µg/ml) ausgebreitet und über Nacht bei 37°C kultiviert, um Transformanten zu 45 erzeugen. Diese Transformanten werden auf einer SOX-Detektormedium-Platte repliziert (Zusammensetzung: 5 g Pepton, 2 g Fleischextrakt, 5 g Hefeextrakt, 1 g NaCl, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄, 500 IE Peroxidase, 0,1 g Dianisidin, 9 g Sarcosin, 15 g Agar, 1 l destilliertes Wasser; pH 7,0), und es erfolgt eine weitere Kultivierung über Nacht bei 37°C.

- Peripherien von vier Kolonien unter etwa 6000 Transformanten hatten sich schwarz(charcoal)gefärbt. Einer 50 der vier Stämme wurde als *Escherichia coli* DH1 pOXI101 bezeichnet. Nach Reinigung wird dieser Stamm in einem BHI-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert und Plasmid-DNA wird auf gleiche Weise wie in Beispiel 2 hergestellt. Das Plasmid, welches das Sarcosinoxidase-Gen und das pACYC 184-Gen enthält, wird als pOXI101 bezeichnet.

Beispiel 4

[Kartierung von pOXI101 und Subklonung]

- Ein pOXI101-DNA-Spaltungsplan wird hergestellt unter Verwendung der Restriktionsendonucleasen ClaI, 60 HpaI, SalI, SmaI und XhoI (alle von Takara Shuzo Co., Ltd.). Die Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt. Ein EcoRI-ClaI 5,3 kb-Fragment, enthaltend zwei XhoI-Stellen, das aus dem pOXI101 erhalten wurde, und ein EcoRI-ClaI 4,3 kb-Fragment, das aus pBR 322 erhalten wurde, werden auf gleiche Weise wie in Beispiel 3(1) hergestellt. Es wurde eine Subklonung durchgeführt einschließlich Kohäsion, *Escherichia coli* DH1-Transformation und Screening nach Transformation, um einen Sarcosinoxidase erzeugenden Klon zu erhalten. Der Klon 65 wird als *Escherichia coli* DH1 pOXI103 (FERM P-9494) bezeichnet. Eine Plasmid-DNA wird aus diesem Stamm auf gleiche Weise wie in Beispiel 2 hergestellt und mit pOXI103 bezeichnet. Der Spaltungsplan wird an diesem Plasmid unter Verwendung der Restriktionsendonucleasen ClaI, HpaI, SalI, SmaI und XhoI (alle von Takara Shuzo Co., Ltd.) hergestellt. Dieser Plan ist in Fig. 2 dargestellt. Man stellt fest, daß gemäß diesem Plan ein

Abschnitt von EcoRI durch die Nachbarschaft von XhoI, enthaltend eine SmaI-Stelle, fehlt. Dieser *Escherichia coli* DHI pOXI103 wird über Nacht in einem BHI-Medium bei 37°C kultiviert und die Sarcosinoxidase-Produktivität wird gemäß der oben erwähnten Sarcosinoxidase-Aktivitäts-Meßverfahren bestimmt. Man stellt fest, daß der Stamm 2 E/ml Sarcosinoxidase erzeugt. Die Basensequenz der DNA mit einem Gehalt an Sarcosinoxidase wird gemäß der Didesoxy-Methode bestimmt unter Verwendung des M13-Phagen [Science, 214, 1205—1210 (1981)]. Fig. 3 zeigt die Basensequenz des Sarcosinoxidase-Gens und die Aminosäuresequenz der Sarcosinoxidase. 5

Beispiel 5

[Herstellung der Sarcosinoxidase] 10

Escherichia coli DHI pOXI103 wird 18 h in 20 ml BHI-Medium unter Belüftung/Rühren bei 37°C unter Verwendung eines 30 l Tankfermenters kultiviert. Die kultivierten Bakterien werden durch 10minütiges Zentrifugieren bei 5000 U/min gesammelt. Die Sarcosinoxidase-Produktivität erreicht 4,6 E/ml. Die Bakterien werden mit 2 l physiologischer Salzlösung gewaschen und in 2 l 10 mMol Phosphatpuffer (pH 7,5) suspendiert. Zu der so hergestellten Suspension gibt man Lysozymchlorid und EDTA-2Na mit einer Endkonzentration von 0,1% bzw. 2 mMol. Nach 60minütiger Inkubation bei 37°C unter Rühren wird das Gemisch 10 min bei 15 000 U/min zentrifugiert und 1,8 l des resultierenden Überstands werden gesammelt. 15

Zu dem Überstand gibt man 1,8 l gesättigte Ammoniumsulfatlösung, um ein Präzipitat zu bilden. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren bei 1200 U/min während 10 min gesammelt, in 300 ml 10 mMol Phosphatpuffer (pH 7,5) aufgelöst und dann auf eine Sephadex G-25(Warenbezeichnung)-Säule gegeben, die mit 10 mMol Phosphatpuffer (pH 7,5) äquilibriert wurde. Es wird eine Entsalzung durchgeführt. Anschließend wird die entsalzte Lösung einer DEAE-Cephalose CL-6B-Ionenaustauschchromatographie unterworfen, wobei die aktive Fraktion gesammelt wird. Diese Fraktion wird entsalzt und gefriergetrocknet. Man erhält 0,807 g eines pulverförmigen Produkts. Die Ausbeute erreicht 36%, wobei die spezifische Aktivität des Produkts 41 E/mg beträgt. 20

Das Molekulargewicht der Sarcosinoxidase, die hergestellt wurde, wird durch die Gelfiltrationsmethode bestimmt. Dabei findet man ein Molekulargewicht von etwa 40 000. Dieses Molekulargewicht ist fast das gleiche wie das aus der Aminosäuresequenz der Substanz berechnete. 25

Mit der vorliegenden Erfindung wurde das Sarcosinoxidase-Gen aufgeklärt sowie die Basen- und die Aminosäuresequenz der Sarcosinoxidase. Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung ein effizientes Verfahren zur Herstellung von Sarcosinoxidase zur Verfügung, und zwar unter Verwendung des Sarcosinoxidase-Gens und basierend auf verschiedenen Genetic Engineering Techniken. 30

- Leerseite -

10 03 89

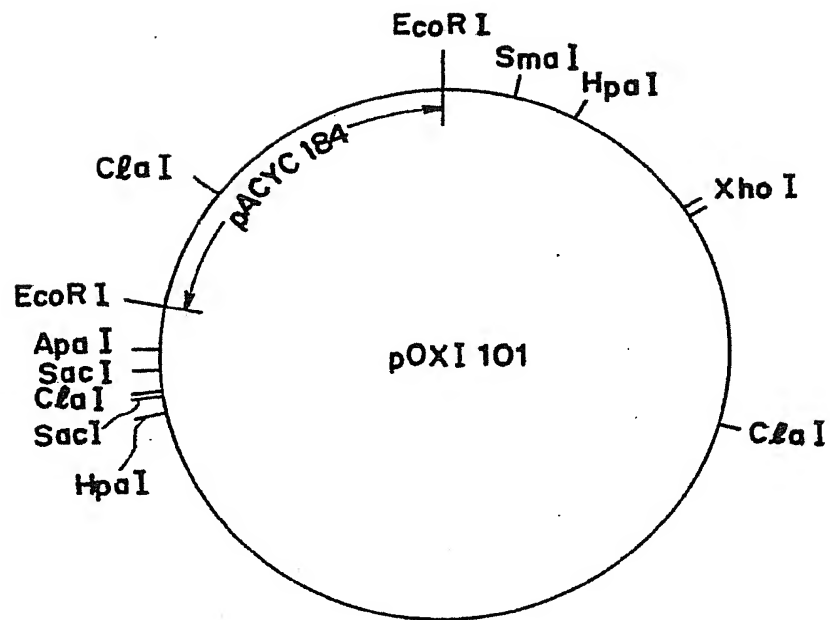
Number: 38 27 168
Int. Cl. 4: C 12 N 9/02
Anmeldetag: 10. August 1988
Offenlegungstag: 23. Februar 1989

45 n

45

3827168

FIG. 1



10-03-83

40

~~50~~

3827168

FIG. 2

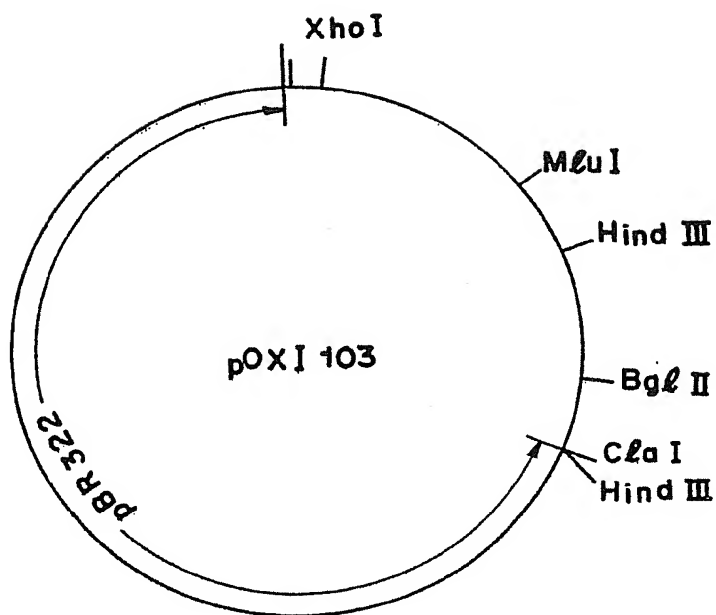


FIG. 3-1

3827168

10 20 30 40 50 60
ATGAGCACAC ATTTTGTATGT CATCGTTGTT GGAGCTGGAT CAATGGGAAT GCGGCGAGGT
70 80 90 100 110 120
TATCAATTAG CAAAGCAAGG AGTCAAAACA TTATTAGTGG ATGCATTTGA TCCGCCGCAT
130 140 150 160 170 180
ACAAACGGAA GCCATCACGG TGATACTCGT ATCATCCGCC ATGCTTACGG TGAGGGAAGA
190 200 210 220 230 240
GAATATGTTC CTCTTGCAAT AAGATCACAA GAGTTATGGT ATGAACTAGA AAAAGAAACA
250 260 270 280 290 300
CACCATAAAA TATTCACGAA AACGGGCGTA CTCGTATTG GTCCTAAAGG TGAATCGGCT
310 320 330 340 350 360
TTCGTTGCAG AAACGATGGA AGCGGCAAAG GAACATTCAT TGACTGTTGA TTTACTGGAA
370 380 390 400 410 420
GGTGATGAAA TAAATAAGCG TTGGCCGGGT ATAACGGTTC CGGAAAATA CAATGCTATT
430 440 450 460 470 480
TTCGAACCGA ACTCAGGTGT ATTATTCACT GAAAATTGTA TTCGTGCCTA CCGCGAGTTA
490 500 510 520 530 540
GCTGAAGCGC GAGGTGCTAA AGTTCTAACA CATAACGCG TTGAGGACTT TGACATTTCA
550 560 570 580 590 600
CCGGACTCAG TCAAAATCGA AACAGCAAAT GGATCATACA CAGCTGATAA ATTAATTGTT
610 620 630 640 650 660
AGCATGGGAG CTTGGAATAG CAAACTACTT TCAAAACTAA ATCTTGACAT CCCATTACAG
670 680 690 700 710 720
CCATATCGTC AAGTGGTAGG TTTCTTTGAA TCCGATGAAT CAAAGTATAG CAATGATATT
730 740 750 760 770 780
GATTTCCCAG GATTCATGGT TGAAGTGCCA AATGGTATTT ATTACGGATT CCCAAGCTTC
790 800 810 820 830 840
GCGGCTGTG GATTGAACT AGGATATCAT ACGTTCGGGC AGAAAATTGA CCCTGATACA
850 860 870 880 890 900
ATTAATCGCG AATTTGGCGT TTATCCAGAA GATGAAAGTA ATCTTCGCGC TTTCTTGAA
910 920 930 940 950 960
GAATATATGC CAGGAGCAAA TGGAGAGTTA AAAAGAGGGG CAGTCTGCAT GTACACGAAA
970 980 990 1000 1010 1020
ACATTAGATG AACATTTTCAT TATAGACTTA CATCCTGAAC ATTCCAACGT AGTCATCGCT

FIG. 3-2

3827168

1030	1040	1050	1060	1070	1080
GCCGGCTTCT	CTGGCCATGG	ATTTAAGTTT	TCCAGTGGAG	TTGGTGAAGT	GCTAAGTCAA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTAGCTTTAA	CTGGTAAAC	AGAGCACGAT	ATTTCATCT	TCTCCATTAA	CCGTCCTGCT
1150	1160	1170			
TTGAAAGAAT	CGTTACAAAA	AACAACATC			

FIG. 4-1

3827168

10 20 30 40 50 60
 ATGAGCACACATTTTGATGTCATCGTTGTTGGAGCTGGATCAATGGGAATGGCGGCAGGT
 MetSerThrHisPheAspValIleValValGlyAlaGlySerMetGlyMetAlaAlaGly

70 80 90 100 110 120
 TATCAATTAGCAAAGCAAGGAGTCAAAACATTATTAGTGGATGCATTTGATCCGCCGCAT
 TyrGlnLeuAlaLysGlnGlyValLysThrLeuLeuValAspAlaPheAspProProHis

130 140 150 160 170 180
 ACAAACGGAAGCCATCACGGTGATACTCGTATCATCCGCCATGCTTACGGTGAGGGAAGA
 ThrAsnGlySerHisHisGlyAspThrArgIleIleArgHisAlaTyrGlyGluGlyArg

190 200 210 220 230 240
 GAATATGTTCTCTTGCATTAAAGATCACAAAGAGTTATGGTATGAACTAGAAAAAGAAACA
 GluTyrValProLeuAlaLeuArgSerGlnGluLeuTrpTyrGluLeuGluLysGluThr

250 260 270 280 290 300
 CACCATAAAATATTCACGAAAACGGGCGTACTCGTATTGGTCCTAAAGGTGAATCGGCT
 HisHisLysIlePheThrLysThrGlyValLeuValPheGlyProLysGlyGluSerAla

310 320 330 340 350 360
 TTCGTTGCAGAAACGATGGAAGCGGCAAAGGAACATTGACTGTTGATTTACTGGAA
 PheValAlaGluThrMetGluAlaAlaLysGluHisSerLeuThrValAspLeuLeuGlu

370 380 390 400 410 420
 GGTGATGAAATAAATAAGCGTTGGCCGGGTATAACGGTTCGGGAAACTACAATGCTATT
 GlyAspGluIleAsnLysArgTrpProGlyIleThrValProGluAsnTyrAsnAlaIle

430 440 450 460 470 480
 TTCGAACCGAACTCAGGTGTATTATTGAGTGAAAATTGTATTTCGTGCCTACCGCGAGTTA
 PheGluProAsnSerGlyValLeuPheSerGluAsnCysIleArgAlaTyrArgGluLeu

490 500 510 520 530 540
 GCTGAAGCGCGAGGTGCTAAAGTTCTAACACATACACGCGTTGAGGACTTTGACATTTCA
 AlaGluAlaArgGlyAlaLysValLeuThrHisThrArgValGluAspPheAspIleSer

550 560 570 580 590 600
 CCGGACTCAGTCAAAATCGAAACAGCAAATGGATCATACACAGCTGATAAATTAATTGTT
 ProAspSerValLysIleGluThrAlaAsnGlySerTyrThrAlaAspLysLeuIleVal

610 620 630 640 650 660
 AGCATGGGAGCTTGGAATAGCAAACTACTTTCAAACTAAATCTTGACATCCCATTACAG
 SerMetGlyAlaTrpAsnSerLysLeuLeuSerLysLeuAsnLeuAspIleProLeuGln

670 680 690 700 710 720
 CCATATCGTCAAGTGGTAGGTTTCTTTGAATCCGATGAATCAAAGTATAGCAATGATATT
 ProTyrArgGlnValValGlyPhePheGluSerAspGluSerLysTyrSerAsnAspIle

730 740 750 760 770 780
 GATTTCCAGGATTTCATGGTTGAAGTGCCAAATGGTATTTATTACGGATTCCCAAGCTTC
 AspPheProGlyPheMetValGluValProAsnGlyIleTyrTyrGlyPheProSerPhe

5048

FIG. 4-2

3827168

790 800 810 820 830 840
GGCGGCTGTGGATTGAACTAGGATATCATACGTTTCGGGCAGAAAATTGACCCTGATACA
GlyGlyCysGlyLeuLysLeuGlyTyrHisThrPheGlyGlnLysIleAspProAspThr

850 860 870 880 890 900
ATTAATCGCGAATTTGGCGTTTATCCAGAAGATGAAAGTAATCTTCGCGCTTTCTTGAA
IleAsnArgGluPheGlyValTyrProGluAspGluSerAsnLeuArgAlaPheLeuGlu

910 920 930 940 950 960
GAATATATGCCAGGAGCAAATGGAGAGTTAAAAAGAGGGGCAGTCTGCATGTACACGAAA
GluTyrMetProGlyAlaAsnGlyGluLeuLysArgGlyAlaValCysMetTyrThrLys

970 980 990 1000 1010 1020
ACATTAGATGAACATTTTCATTATAGACTTACATCCTGAACATTCCAACGTAGTCATCGCT
ThrLeuAspGluHisPheIleIleAspLeuHisProGluHisSerAsnValValIleAla

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GCCGGCTTCTCTGGCCATGGATTTAAGTTTCCAGTGGAGTTGGTGAAGTGCTAAGTCAA
AlaGlyPheSerGlyHisGlyPheLysPheSerSerGlyValGlyGluValLeuSerGln

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TTAGCTTTAACTGGTAAAACAGAGCACGATATTTCAATCTTCTCCATTAACCGTCCTGCT
LeuAlaLeuThrGlyLysThrGluHisAspIleSerIlePheSerIleAsnArgProAla

1150 1160 1170
TTGAAAGAATCGTTACAAAAACAACACTATC
LeuLysGluSerLeuGlnLysThrThrIle